

Aus dem Institut für Rechtsmedizin
der Universität Erlangen - Nürnberg
Vorstand: Professor Dr. med. H.-B. Wuermeling

Photometrische Technik zur Bestimmung der Restaktivität der Serumcholinesterase nach Vergiftung mit Paraoxon

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen - Nürnberg

vorgelegt von
Ferdinand Lochner
aus Coburg

1981



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546216_0072

Aus dem Institut für Rechtsmedizin
der Universität Erlangen - Nürnberg
Vorstand: Professor Dr. med. H.-B. Wuermeling

Photometrische Technik zur Bestimmung der Restaktivität der Serumcholinesterase nach Vergiftung mit Paraoxon

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen - Nürnberg

vorgelegt von
Ferdinand Lochner
aus Coburg

Gedruckt mit Erlaubnis der Medizinischen Fakultät
der Universität Erlangen-Nürnberg



Dekan: Prof. Dr. V. Becker

Referent: **Prof. Dr. Dr. M. Goldmacher-v. Mallinckrodt**

Korreferent: Prof. Dr. H.-B. Wuermeling

Tag der mündlichen Prüfung: 12.10.1981

Inhalt s v e r z e i c h n i s

	Seite
1. <u>Einleitung</u>	1
2. <u>Problemstellung</u>	6
3. <u>Anti-Cholinesterase-Technik</u>	7
4. <u>Cholinesterase-Test-Combination</u>	8
4.1. Testprinzip	9
4.2. Cholinesterase-Normalwerte	10
4.3. Reagenzien	10
4.4. Herstellung und Haltbarkeit der Lösungen	11
4.5. Bestimmungsansatz	12
4.6. Berechnung	12
5. <u>Eigene Versuchsanordnung</u>	13
5.1. Modifikation der "Test-Combination-Cholinesterase"	13
5.2. E 600-Verdünnung zur Vergiftung des Serums	14
5.2.1. Phosphatpuffer pH 7,7 in 0,9 % NaCl-Lösung	15
5.2.2. Verschiedene Methoden zur Herstellung der Giftlösung	16
5.2.3. Herstellung der E 600-Verdünnung	17
5.3. Versuchsablauf	19
5.3.1. Unvergiftete Probe	19
5.3.2. Vergiftete Probe	20
5.3.3. Inkubation	20
5.3.4. Meßvorgang	20
5.3.5. Berechnung der Cholinesterase-Aktivität	23
5.3.6. Berechnung der Cholinesterase-Restaktivität	23

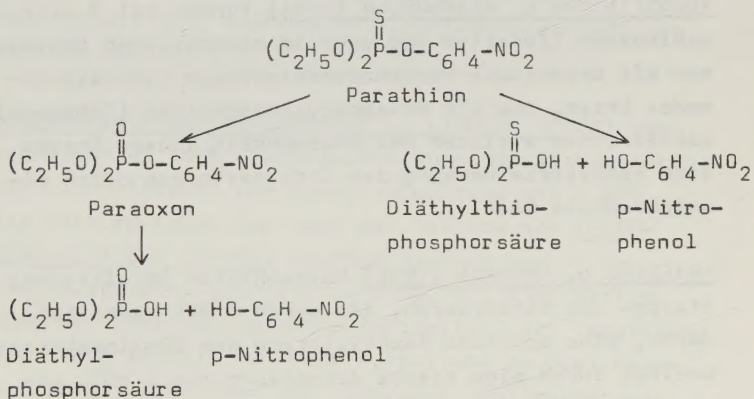
6.	<u>Versuchsergebnisse</u>	24
6.1.	Richtigkeit	28
6.2.	Präzision	29
6.3.	Untersuchungen mit 40 Humanseren	32
6.4.	Aufgliederung der 40 gemessenen Humanseren in drei Gruppen hoher, mittlerer und nie- driger Cholinesterase-Restaktivität	37
7.	<u>Die Möglichkeit der Serienmessung bei ge- ringem Zeitaufwand</u>	38
8.	<u>Diskussion</u>	40
9.	<u>Zusammenfassung</u>	41
10.	<u>Literaturverzeichnis</u>	42

1. Einleitung

Parathion (E 605, O,O-Diäthyl-O-p-Nitrophenylthio-phosphat) nimmt seit Jahren aufgrund seiner Wirksamkeit einen wichtigen Platz unter den Insektiziden ein.

Dieser Phosphorsäureester, von primär relativ geringer Giftigkeit, wird jedoch im Warmblüterorganismus in das hochgiftige Sauerstoffanalogum Paraoxon (E 600) umgewandelt. Des weiteren wird Paraoxon hydrolytisch in Paranitrophenol und Diäthylphosphorsäure gespalten, die beide ungiftig sind.

Auch eine Hydrolyse des nicht oxidierten Parathion (E 605) in Diäthylphosphorsäure und p-Nitrophenol ist möglich.



Stoffwechsel von Parathion (POORE und NEAL, 1972)

ALDRIDGE (1953 a) fand im Serum von Kaninchen, Ratte und Pferd zwei Typen von Esterasen, die er aufgrund ihrer unterschiedlichen Hemmbarkeit durch E 600 in A-Esterasen und B-Esterasen einteilte. Während E 600 A-Esterasen nicht hemmt, werden B-Esterasen durch Paraaxon in einer Konzentration von 10^{-7} bis 10^{-8} mol inaktiviert.

Wenig später fand ALDRIDGE (1953 b) im Serum von Kaninchen, Ratte und Pferd ein Paraaxon hydrolysierendes Enzym, welches sich mit der früher beschriebenen A-Esterase als identisch erwies, jedoch nicht mit der sauren und alkalischen Phosphatase.

AUGUSTINSSON u. HEIMBÜRGER (1954) fanden bei 7 verschiedenen Tierarten und auch im menschlichen Organismus ein organische Phosphorverbindungen hydrolysierendes Enzym, das sie Phosphorylphosphatase (Tabunase) nannten. Sie stellten bei Anwesenheit dieses Enzyms eine reduzierte Hemmung der Cholinesterase durch Alkylphosphate fest.

FRIEBERG u. ERDMANN (1959) beobachteten in vitro bei Pferde- und Rinderseren, die durch E 600 vergiftet waren, eine spontane Reaktivierung der Cholinesterase, bedingt durch eine rasche Zersetzung des E 600, was sie auf die Wirkung einer Phosphorylphosphatase zurückführten.

MAIN (1960) berichtet über die Reinigung eines E 600 spaltenden Enzyms aus Schafserum.

KRISCH (1968) beschreibt einen einfachen photometrischen Test zur Messung der enzymatischen Hydrolyse von E 600 durch menschliches Serum. Nach Vergiftung des Serums mit Paraoxon maß er die Extinktion des durch Hydrolyse freigesetzten p-Nitrophenol und konnte zwei sich überlagernde Gruppen von Personen feststellen, die sich hinsichtlich ihrer E 600 spaltenden (Paraoxonase-) Aktivität unterschieden.

KRISCH (1968) ermittelt bei beiden Aktivitätsgruppen gleiche Michaelis-Konstanten. Er weist auf die Möglichkeit hin, daß die Aktivitätsunterschiede genetisch bedingt sind.

GELDMACHER - V. MALLINCKRODT u. LINDORF (1969) verwendeten bei ihren Untersuchungen menschlicher Serumcholinesterasen und deren Vergiftung mit E 600 die Warburg-Apparatur nach der Methode von FRIEDBERG u. SAKAI (1958). Es fand hierbei die Anti-Cholinesterase-Technik Anwendung, die eine Bestimmung der Cholinesterase-Restaktivität nach Vergiftung mit E 600 ermöglicht. Eine Aufteilung in drei Gruppen hoher, mittlerer und niedriger Cholinesterase-Restaktivität konnte dabei festgestellt werden, was auf einen Zusammenhang mit den Aktivitätsunterschieden der menschlichen Paraoxonase hindeutete.

Eine hoch signifikante Korrelation fanden

GELDMACHER - V. MALLINCKRODT et al. (1972) zwischen Serumcholinesterase-Restaktivität nach Vergiftung mit Paraoxon und der Aktivität der E 600 spaltenden Paraoxonase, die mit der Methode nach KRISCH (1968) bestimmt wurde.

Es ergab sich, daß eine hohe Paraoxonase-Aktivität einer hohen Cholinesterase-Restaktivität entsprach. Da trotz Unterschiede in der Methode, der Apparaturen und der Bedingungen (pH-Wert, Temperatur, Inkubationszeit, Pufferzusammensetzung etc.) ein hoch signifikanter Korrelationskoeffizient ermittelt werden konnte, erschien es angebracht, die Cholinesterase-Restaktivität in Prozent ausgedrückt als Indikator der Paraoxonase-Aktivität heranzuziehen.

Bei Messungen der Cholinesterase-Restaktivität von 75 Seren nach Inkubation mit einer E 600-Konzentration von $3,2 \times 10^{-8}$ molar fanden GELDMACHER - V. MALLINCKRODT u. LINDORF (1969) eine Aufteilung in Gruppen niedriger, mittlerer und hoher Restaktivität. (siehe Tabelle 1)

Dieser Polimorphismus bezüglich der Paraoxonase-Aktivität konnte durch weitere umfangreiche Untersuchungen durch GELDMACHER - V. MALLINCKRODT et al. (1979) gesichert werden. Bei europäischen Personen fand man niedrige, mittlere und hohe Aktivitäten in einem Verhältnis von etwa 60 : 34 : 6. Wie bereits KRISCH (1968) vermutete, bestätigte sich, daß die drei Gruppen genetisch determiniert sind, entsprechend einem einfachen intermediären Erbgang.

Tabelle 1:

Cholinesterase-Restaktivität nach Vergiftung mit
Paraoxon von 75 menschlichen Seren nach GELDMACHER -
V. MALLINCKRODT u. LINDORF (1969)

Gruppe	Anzahl der Personen	Restaktivität in % d. Normalaktivität
I	38	0-5,5 (niedrig)
II	22	13-21 (mittel)
III	15	29-51 (hoch)

Eine Abhängigkeit der Paraoxonase-Aktivität von Al-
ter und Geschlecht sowie ein Zusammenhang mit den
Blutgruppen des ABO-Systems sowie des Rh-Systems
konnte nicht gefunden werden.

(GELDMACHER - V. MALLINCKRODT et al. (1973)
DUMBACH (1976), GELDMACHER - V. MALLINCKRODT,
DUMBACH und HOMMEL (1979)

2. Problemstellung

Die Anti-Cholinesterase- (Anti-ChE-) Technik bietet den großen Vorteil, neben Paraoxon auch zur Untersuchung anderer Alkylphosphate geeignet zu sein, bei denen die direkte photometrische Messung unmöglich ist, da z. B. keine p-Nitrophenolabspaltung stattfindet.

Sie wurde bereits erfolgreich von GELDMACHER - V. MAL-LINCKRODT et al. (1969) mit der Warburg-Apparatur zur Bestimmung der Cholinesterase-Restaktivität nach Vergiftung mit DFP und DDVP angewendet. Diese Methode ist jedoch relativ aufwendig und erfordert einen hohen Arbeitsaufwand.

Daher lag es nahe, nach einer neuen Methode zu suchen, die diese Nachteile nicht aufweist. Wir suchten nach einer Methode mit folgenden Vorteilen:

- gute Präzision
- einfache und schnelle Messung
- geringer Arbeitsaufwand

Wir versuchten, dieses Ziel auf photometrischem Weg mit Hilfe der im Handel befindlichen "Test-Combination Cholinesterase" der Fa. Boehringer Mannheim zu erreichen.

3. Anti-Cholinesterase-Technik

E 600 (wie auch andere Alkylphosphate) hemmt die Cholinesterase des menschlichen Serums; dementsprechend ist die Cholinesterase-Aktivität des mit Paraaxon vergifteten Serums erheblich reduziert.

Das im menschlichen Serum enthaltene Enzym Paraaxonase ist in der Lage, E 600 hydrolytisch in Diäthylphosphat und p-Nitrophenol zu spalten. Entsprechend der Aktivität dieses Enzyms wird die Cholinesterase in geringerem Maße gehemmt. Setzt man in einer standardisierten Meßmethode die Cholinesterase-Aktivität eines nicht mit E 600 vergifteten Serums in Relation zur Cholinesterase-Aktivität des gleichen mit Paraaxon vergifteten Serums, so erhält man aus der resultierenden prozentualen Cholinesterase-Restaktivität einen Parameter, der geeignet ist, die Paraaxonase-Aktivität auszudrücken.

Beispielsweise wird bei hoher Paraaxonase-Aktivität die Cholinesterase weniger stark gehemmt als bei niedriger, woraus sich eine höhere prozentuale Cholinesterase-Restaktivität ergibt.

In Tabelle 2 werden diese Zusammenhänge erläutert:

Tabelle 2:

Zahlenbeispiele hoher, mittlerer und niedriger Paraaxonase-Aktivität

Paraaxonase-Aktivität	hoch	mittel	niedrig
ChE-Aktivität "unvergiftet"	9853 U/l	9853 U/l	5865 U/l
ChE-Aktivität "vergiftet"	4692 U/l	1525 U/l	117 U/l
ChE-Rest-Aktivität	47,6 %	15,5 %	2 %

4. Cholinesterase-Test-Combination

Wir verwendeten für unsere Versuche zur Bestimmung der Cholinesterase-Aktivität des menschlichen Serums die "Test-Combination Cholinesterase" der Fa. Boehringer Mannheim (Best. Nr. 124 133).

Der Test beruht auf einer von KNEDEL, M. und BÖTTGER, R. (1967) beschriebenen Methode.

4.2. Cholinesterase-Normalwerte

Auf dem Beipackzettel zur "Test-Combination Cholinesterase" werden als Cholinesterase-Normalwerte im menschlichen Serum 3000 - 9300 U/l (25°C) angegeben.

4.3. Reagenzien

Die "Test-Combination Cholinesterase" enthält bereits fertig zum Gebrauch abgewogene Reagenzien, entsprechend der Tabelle 3:

Tabelle 3:

Reagenzien der "Test-Combination Cholinesterase"

Inhalt	Konzentration d. gebrauchsfertigen Lsg.:	Endkonzentration im Test:
1. <u>Puffer/</u> <u>Chromogen</u>		
Phosphat- puffer	52 mmol/l pH 7,7	50 mmol/l pH 7,7
5,5'-Dithio- bisnitroben- zoat	0,26 mmol/l	0,25 mmol/l

Inhalt	Konzentration	Endkonzentra-
	d. gebrauchsfertigen Lsg.:	tion im Test:
2. <u>Substrat</u>		
Butyrylthio-	218 mmol/l	7 mmol/l
cholinjodid		

4.4. Herstellung und Haltbarkeit der Lösungen

1. Puffer / Chromogen

Der Inhalt der Flasche wird mit 100 ml dest. Wasser gelöst.

Haltbarkeit:

bei +4°C in dunkler Flasche sechs Wochen

2. Substrat

Der Inhalt der Flasche wird mit 3 ml dest. Wasser gelöst.

Haltbarkeit:

bei +4°C sechs Wochen

4.5. Bestimmungsansatz

Wellenlänge: Hg 405 nm (400-440 nm)

Meßtemperatur: 25°C

Küvette: 1 cm Schichtdicke

Messung erfolgt gegen Luft (Extinktionszunahme)

In die Küvette werden pipettiert:

Lösung 1	3,0 ml
(Puffer/Chromogen)	
Probe	0,02 ml

Lösung 2	0,10 ml
(Substrat)	

Dann wird gemischt und die Extinktion abgelesen.
Aus den Extinktionsdifferenzen pro 30 sec. ($\Delta E/30$ sec.) wird der Mittelwert gebildet und in die Berechnung eingesetzt.

4.6. Berechnung

Die Cholinesterase-Aktivität wird nach der Formel ermittelt:

$$U/l = 23\,460 \times \Delta E_{405\text{ nm}}/30\text{ sec}$$

Die gesuchte Cholinesterase-Aktivität läßt sich auch direkt aus der beigefügten Werte-Tabelle entnehmen.

5. Eigene Versuchsanordnung

Die "Test-Combination Cholinesterase" ermöglicht eine schnelle und präzise Bestimmung der Serumcholinesterase-Aktivität. Wir versuchten daher mit dieser Methode unter Anwendung der Anti-Cholinesterase-Technik, die Paraoxonase-Aktivität des menschlichen Serums zu untersuchen.

Diese Technik beruht, wie bereits erwähnt, auf dem Prinzip des Vergleichs der Cholinesterase-Aktivitäten von mit E 600 vergifteten und unvergifteten Seren.

Zu diesem Zweck war es notwendig, die oben beschriebene Versuchsanordnung der "Test-Combination Cholinesterase" zur Bestimmung der Cholinesterase-Aktivität für unsere Zwecke zu modifizieren.

5.1. Modifikation der "Test-Combination Cholinesterase"

Für unsere Versuchsanordnung konnte kein reines Serum als Probe verwendet werden, da das Serum mit E 600 vergiftet werden mußte. Wir verwendeten als Probe eine Mischung von 0,05 ml reinem Serum

mit 0,45 ml einer E 600 / Phosphatpuffer-Lösung. Das reine Serum wurde also im Verhältnis 1 : 10 verdünnt. Da in der "Test-Combination Cholinesterase" eine Probe von 0,02 ml reinem Serum vorgeschrieben ist, verwendeten wir die 10-fache Menge (0,2 ml) unseres verdünnten Serums als Probe.

Dementsprechend reduzierten wir die beim Bestimmungsansatz in die Küvette zu pipettierende Menge der Lösung 1 (Puffer/Chromogen) von 3 ml auf 2,8 ml. Um die Puffer/Chromogenkonzentration im Bestimmungsansatz dennoch gleich der ursprünglichen Konzentration zu halten, reduzierten wir die Menge des zur Herstellung der Lösung 1 benötigten dest. Wassers von 100 ml auf 93,4 ml. Vorteil dieser Modifikation ist die Verwendbarkeit des in seiner Zusammensetzung optimierten Testes für unsere Zwecke. Außerdem können Formel und Werte-Tabelle zur schnellen Ermittlung der Cholinesterase-Aktivitäten weiterbenutzt werden, was eine rasche Testauswertung erlaubt.

5.2. E 600-Verdünnung zur Vergiftung des Serums

Bei Anwendung der Anti-ChE-Technik wird eine Serumprobe mit Paraoxon vergiftet, so daß die Cholinesterase gehemmt wird. Wir versetzten unser Serum im Verhältnis 1 : 10 mit einer Paraoxon/Puffer-Lösung. Die Konzentration dieser E 600-Lösung mußte so bemessen werden, daß eine Differenzierung in

Typen hoher, mittlerer und niedriger Cholinesterase-Restaktivität möglich wurde.

Zur Verdünnung des 99 % Paraoxons verwendeten wir einen Phosphatpuffer mit pH 7,7 in 0,9 % NaCl-Lösung.

5.2.1. Phosphatpuffer pH 7,7 in 0,9 % NaCl-Lösung

a. Notwendige Reagenzien

Kaliumhydrogenphosphat, KH_2PO_4

MG 136,09

52 mmolare Lösung: 7,0767 g/l

Natriumhydrogenphosphat, Na_2HPO_4

MG 177,99

52 mmolare Lösung: 9,2555 g/l

Natriumchlorid, NaCl

NaCl-Lösung 0,9 %:

9 g NaCl in 1000 ml Aqua bidest lösen

b. Herstellung der Pufferlösung

I. 7,0767 g KH_2PO_4 in 1000 ml NaCl-Lösung 0,9 % lösen.

II. 9,2555 g Na_2HPO_4 in 1000 ml NaCl-Lösung 0,9 % lösen.

III. Zu Lsg. II (Na_2HPO_4 -Lsg.) so lange Lsg. I (KH_2PO_4 -Lsg.) zugeben, bis pH 7,7 erreicht wird. Kontrolle unter ständigem Rühren mit geeichtem pH-Meter!

5.2.2. Verschiedene Methoden zur Herstellung der Giftlösung

In Anlehnung an die Versuche von GELDMACHER - V. MALLINCKRODT et al. mit der Warburg-Apparatur begannen wir mit einer E 600-Konzentration von $3,2 \times 10^{-8}$ molar. Es wurden zunächst 1 μl E 600 (99 %ig) auf 90 ml Phosphatpuffer pH 7,7 (in 0,9 % NaCl) gegeben, davon dann 20 μl genommen und zu 27 ml des obigen Phosphatpuffers gebracht.

Es stellte sich heraus, daß diese Lösung das Serum zu stark vergiftete, so daß keine sichere Differenzierung in hohe, mittlere und niedere Typen möglich war.

Wir reduzierten hierauf die E 600-Konzentration durch eine zusätzliche dritte Verdünnung. Wir mußten jedoch feststellen, daß durch die vielen Abmeßvorgänge bei einer dreimaligen Verdünnung und den damit verbundenen Ungenauigkeiten nur eine ungenügende Präzision erzielt werden konnte.

Daher kehrten wir zu einer zweimaligen Verdünnung

unter Anwendung genauester Abmeßmethoden (Konstriktionspipette, Meßkolben) zurück.

Daß selbst jetzt noch keine ausreichende Reproduzierbarkeit der Giftkonzentration erreicht werden konnte, führten wir auf die schlechte Löslichkeit von Paraoxon in wäßrigem Medium zurück, weshalb keine homogene Lösung erzielt werden konnte.

Durch Anwendung von Thesit als Lösungsvermittler konnten wir bessere Ergebnisse erzielen.

Wir gelangten schließlich zu der folgenden Vorschrift:

5.2.3. Herstellung der E 600-Verdünnung

a. Notwendige Geräte

Ultraschall-Wasserbad
Rüttler zum Mischen der Lösungen
1 μ l Konstriktionspipetten
50 μ l Konstriktionspipetten
100 ml Meßkolben
Waage

b. Notwendige Chemikalien und Lösungen

Paraoxon (E 600) 99 %
Phosphatpuffer pH 7,7 in 0,9 % NaCl
Thesit

c. Herstellung der Giftlösung

Alle Giftlösungen dürfen auf keinen Fall mit dem Mund pipettiert werden!

I.

1 g Thesit wird auf der Waage in 100 ml Phosphatpuffer (im Meßkolben abmessen) einpipettiert. Das Thesit muß vollständig in Lösung gehen. (Evtl. Beschleunigung des Lösungsvorganges im Ultraschallbad)

II.

In die Thesit/Phosphatpuffer-Lösung wird 1 μ l E 600 mit der Konstriktionspipette einpipettiert.

Dabei ist besonders zu beachten:

- Pipettenspitze vor Einlassen des E 600 in die Thesit/Puffer-Lösung sorgfältig mit saugfähigem Papier abwischen.
- Durch mehrmaliges Aufsaugen und Ablassen von Thesit/Puffer-Lösung in der Pipette haftendes E 600 ausspülen.

III.

Diese erste Verdünnung wird 5 min ins Ultraschallbad gestellt und anschließend 5 min auf dem Rüttler geschüttelt, damit das E 600 vollständig in Lösung geht.

IV.

50 μ l dieser ersten Verdünnung werden mit einer Konstriktionspipette (abwischen, spülen!) in 100 ml (mit Meßkolben abmessen) des Phosphatpuffers pH 7,7 pipettiert. Diese zweite Verdünnung wird 5 min auf dem Rüttler gemischt.

Nach der oben beschriebenen Methode erhielten wir eine gut reproduzierbare Paraaxon-Verdünnung, die geeignet war, die Serum-Cholinesterase derart zu vergiften, daß Paraaxonase-Typen hoher, mittlerer und niederer Aktivität gut unterschieden werden konnten.

5.3. Versuchsablauf

Nach Herstellung der Pufferlösung und der Giftverdünnung werden die Meßproben angesetzt. Zur Untersuchung des Serums einer Person werden zwei Proben (vergiftet und unvergiftet) hergestellt.

5.3.1. Unvergiftete Probe

In 0,45 ml Phosphatpuffer pH 7,7 (in 0,9 % NaCl) werden 0,05 ml Humanserum mit der Kolbenhubpipette pipettiert.

5.3.2. Vergiftete Probe

In 0,45 ml Giftlösung werden 0,05 ml Humanserum mit der Kolbenhubpipette pipettiert.

Beide Serumverdünnungen werden also auf die gleiche Weise hergestellt, nur daß in der vergifteten Probe Paraoxon in geeigneter Menge vorhanden ist. Das Serum sollte immer im Kühlschrank gelagert werden und nur zur Probenherstellung kurz entnommen werden.

5.3.3. Inkubation

Die beiden Proben werden im Abstand von 5 min hergestellt, beschriftet und sofort in ein Wasserbad von genau $+30^{\circ}\text{C}$ zur Inkubation gestellt. Inkubiert wird genau eine Stunde.

5.3.4. Meßvorgang

a. Notwendige Geräte

- Photometer (Wir verwendeten ein Spektralphotometer vom Typ Beckman Model 24 A)
- Stoppuhr oder an das Photometer angeschlossener Schreiber
- Kolbenhubpipetten: 0,1 ml, 0,2 ml
- QS-Normalküvetten mit 10 mm Schichtdicke ("vergiftete" und "unvergiftete" Proben in verschiedenen Küvetten messen!)

b. Notwendige Meßlösungen

Es werden die fertig abgewogenen Reagenzien der "Test-Combination Cholinesterase" der Fa. Boehringer Mannheim verwendet. Die Herstellung der Meßlösungen erfolgt in der modifizierten weiter oben erläuterten Art.

Lösung 1:

Puffer/Chromogen (Phosphatpuffer pH 7,7 / 5,5'-Dithiobisnitrobenzoat):

Der Flascheninhalt wird mit 93,4 ml dest. Wasser gelöst.

In dunkler Flasche im Kühlschrank aufbewahren!

Haltbarkeit: ca. sechs Wochen

Lösung 2:

Substrat (Butyrylthiocholinjodid):

Der Flascheninhalt wird mit 3 ml dest. Wasser gelöst.

Im Kühlschrank aufbewahren!

Haltbarkeit: sechs Wochen

c. Bestimmungsansatz

Nach genau 60 min Inkubationszeit werden die Proben gemessen. Es ist zweckmäßig, die beiden Proben in Abständen von 5 min anzusetzen. Für den Meßvorgang stehen dann ebenfalls 5 min zur Verfügung, die absolut ausreichen, die Messung durchzuführen. Die Messung der beiden Proben ("vergiftet" und "unvergiftet") erfolgt auf die gleiche Weise, jedoch mit unterschiedlichen Küvetten und Pipetten, um Fehler durch Kontamination zu vermeiden. (Jeweils neue Kunststoff-Spitzen für Kolbenhubpipetten verwenden!)

In die auf $+30^{\circ}\text{C}$ vorgewärmte Küvette werden der Reihe nach pipettiert:

- a) 2,8 ml Lsg. 1 (Puffer/Chromogen)
- b) 0,2 ml Probe ("vergiftet" bzw. "unvergiftet")
- c) 0,1 ml Lsg. 2 (Substrat)

Hinweis:

Lösung 1 und Lösung 2 müssen vor der Messung durch Einstellen ins Wasserbad auf $+30^{\circ}\text{C}$ vorgewärmt werden.

Nach gründlichem Durchmischen wird bei der Wellenlänge von 405 nm in Abständen von 30 sec die Extinktion abgelesen (Stoppuhr).

Aus den Extinktionsdifferenzen pro 30 sec ($\Delta E/30 \text{ sec}$) nach jeweils 30, 60 und 90 sec wird der Mittelwert gebildet und dieser in die Berechnung eingesetzt.

5.3.5. Berechnung der Cholinesterase-Aktivität

Die Aktivität der Cholinesterase entnimmt man entweder der Tabelle, die der "Test-Combination Cholinesterase" beiliegt oder berechnet sie nach der Formel:

$$U/1 = 23460 \times \Delta E_{405 \text{ nm}}/30 \text{ sec}$$

5.3.6. Berechnung der Cholinesterase-Restaktivität

Durch Messung der "vergifteten" und "unvergifteten" Probe wird jeweils die Cholinesterase-Aktivität ermittelt. Aus beiden Werten errechnet sich die Cholinesterase-Restaktivität nach der Formel:

$$\text{ChE-Restakt.} = \frac{\text{ChE-Akt. "vergiftete" Probe} \times 100}{\text{ChE-Akt. "unvergiftete" Probe}}$$

6. Versuchsergebnisse

Wir verwendeten bei unseren Untersuchungen zur Ermittlung der Extinktionsdifferenzen ($\Delta E/30 \text{ sec}$) einen an das Photometer angeschlossenen Schreiber, der besonders bei umfangreichen Serienmessungen eine Arbeitserleichterung darstellt.

Abbildung 1, 2 und 3 zeigen drei typische Kurven, die uns der Schreiber bei der Messung je eines Serums hoher, mittlerer und niedriger Cholinesterase-Restaktivität lieferte. Da deren Steigung der jeweiligen Cholinesterase-Aktivität proportional ist, entspricht die flachere Gerade der Cholinesterase-Aktivität des unvergifteten, die steilere derjenigen des vergifteten Serums.

Bei den Kurven fällt besonders der lineare Extinktionsanstieg auf. Selbst bei Seren mit sehr hoher Cholinesterase-Aktivität und somit sehr schnell ablaufender Farbreaktion ist ein linearer Extinktionsanstieg über 2 min zu beobachten. Da die Reaktion so lange konstant abläuft, bleibt ausreichend Zeit für die Messung.

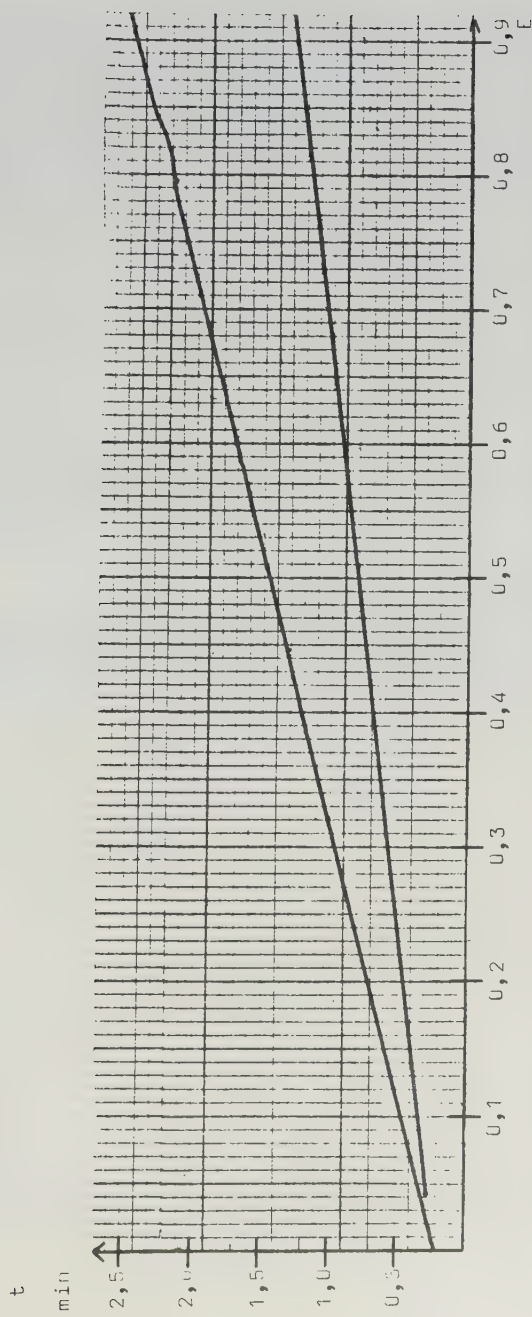


Abb. 1: Extinktionskurven bei Messung eines Serums hoher Cholinesterase-Restaktivität

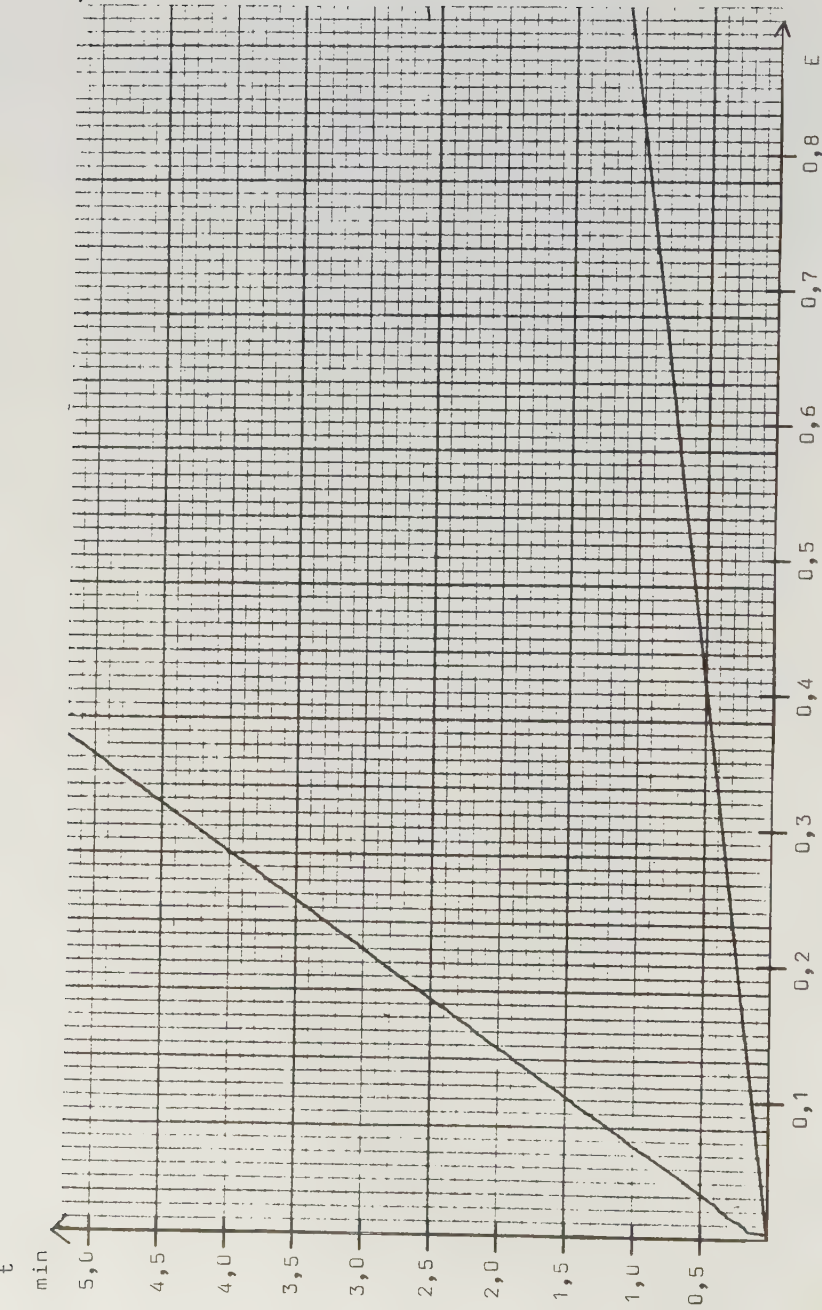


Abb. 2: Extinktionskurven bei Messung eines Serums mittlerer Cholinesterase-Restaktivität

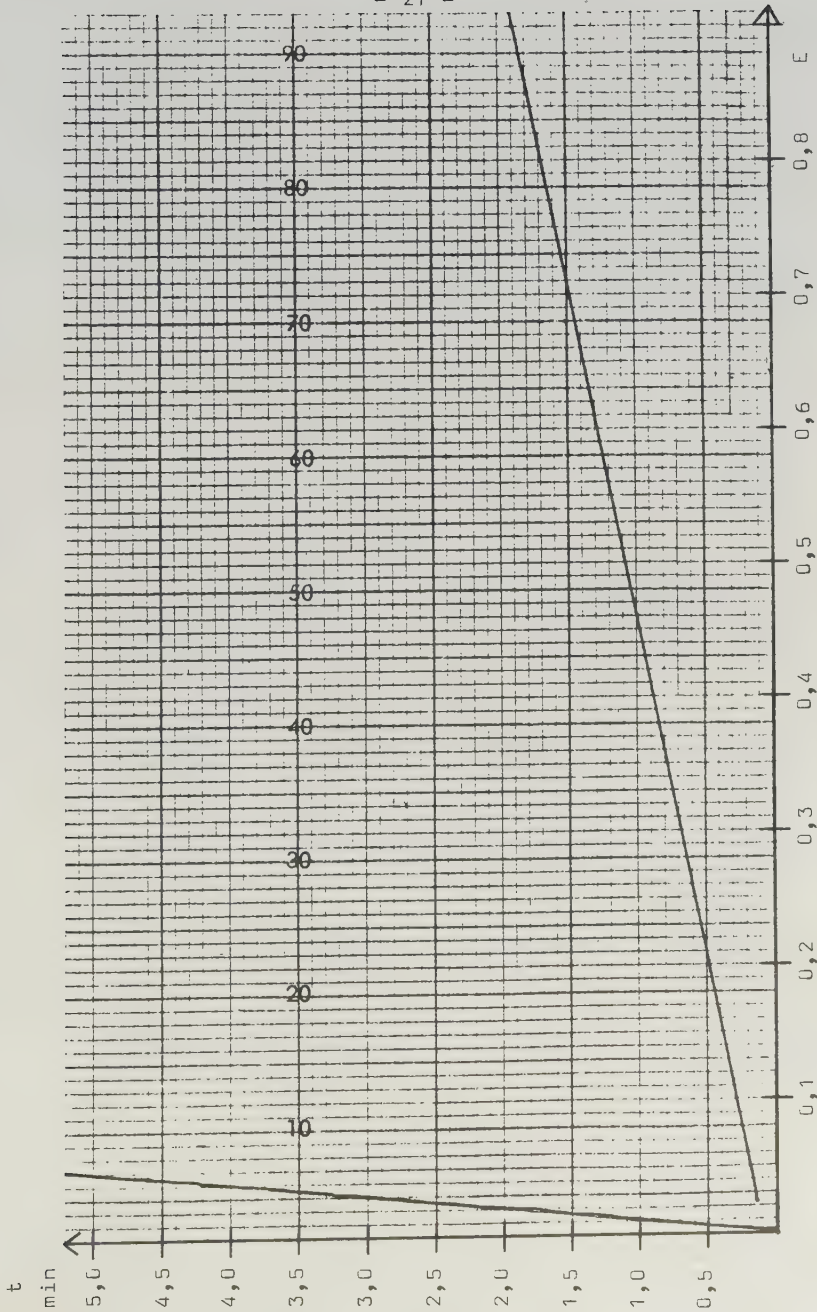


Abb. 3: Extinktionskurven bei Messung eines Serums niedriger Cholinesterase-Restaktivität

6.1. Richtigkeit

Um die Richtigkeit unserer Methode zu prüfen, untersuchten wir jeweils ein Serum hoher, mittlerer und niedriger Aktivität. Die Paraoxonase-Aktivität dieser Seren war vorher mit Hilfe der Methode nach KRISCH (1968) vielfach überprüft worden.

Durch unsere Messungen konnten wir die drei Aktivitäts-Typen ebenfalls deutlich unterscheiden. In Tabelle 4 sind die Ergebnisse wiedergegeben.

Tabelle 4:

Eigene Meßwerte im Vergleich zu den Meßergebnissen (in Klammern) bei der Methode nach KRISCH (1968) von Seren mit typisch hoher, mittlerer und niedriger Paraoxonase-Aktivität

Paraoxonase-Aktivität	hoch (430 U/l)	mittel (257 U/l)	niedrig (80 U/l)
ChE-Aktivität "unvergiftet"	9853,2 U/l	3894,4 U/l	7155,3 U/l
ChE-Aktivität "vergiftet"	4692,0 U/l	750,7 U/l	195,5 U/l
ChE-Rest-Aktivität	47,6 %	19,3 %	2,7 %

6.2. Präzision

Bei all unseren Versuchen zur Präzision arbeiteten wir mit einem Serum von sehr geringer Paraoxonase-Aktivität, da diese Seren am schwierigsten zu messen waren und hier die größten Abweichungen auftraten.

1.

Wir führten 12 Messungen in Abständen von jeweils 5 min durch. Bei allen Messungen wurde das gleiche Serum von niedriger Paraoxonase-Aktivität verwendet. Giftverdünnung und Puffer wurden einmal angemischt und für alle 12 Messungen verwendet.

Die Ergebnisse sind in Tabelle 5 aufgeführt.

Für die ChE-Restaktivität ergibt sich daraus eine Standardabweichung von $s = 0,212$ und ein Variationskoeffizient von $v = 7,81 \%$.

2.

Da die Herstellung der Paraoxonlösung zur Vergiftung des Serums in stets gleicher Konzentration die größten Schwierigkeiten bereitete, führten wir 12 Messungen mit jeweils neu angemischter Giftlösung durch. Serum und Puffer waren stets die gleichen. Die Ergebnisse zeigt Tabelle 6.

Für die ChE-Restaktivität ergibt sich daraus eine Standardabweichung von $s = 0,2955$ und ein Variationskoeffizient von $v = 10,15 \%$.

Tabelle 5:

12 Meßergebnisse zur Präzision - Serum, Giftverdünnung und Puffer waren bei allen 12 separat durchgeführten Messungen identisch.

	ChE-Aktivität "unvergiftet"	ChE-Aktivität "vergiftet"	ChE-Rest- Aktivität
	U/l	U/l	%
1.	7272,6	234,6	3,23
2.	7155,3	211,1	2,95
3.	7038,0	211,1	3,00
4.	7155,3	187,7	2,62
5.	7155,3	187,7	2,62
6.	7155,3	187,7	2,62
7.	7038,0	187,7	2,66
8.	7155,3	187,7	2,62
9.	7272,6	187,7	2,58
10.	7272,6	187,7	2,58
11.	7155,3	187,7	2,62
12.	7038,0	187,7	2,60

Tabelle 6:

12 Meßergebnisse zur Präzision - die Giftverdünnung wurde vor jeder Messung neu angemischt - Serum und Puffer waren stets identisch.

	ChE-Aktivität "unvergiftet"	ChE-Aktivität "vergiftet"	ChE-Rest- Aktivität
	U/l	U/l	%
1.	7272,6	187,7	2,58
2.	7155,3	211,1	2,95
3.	7038,0	187,7	2,60
4.	7155,3	211,1	2,95
5.	7155,3	187,7	2,62
6.	7155,3	211,1	2,95
7.	7038,0	234,6	3,33
8.	7155,3	211,1	2,95
9.	7272,6	211,1	2,90
10.	7272,6	187,7	3,54
11.	7155,3	285,1	2,62
12.	7038,0	187,7	3,00

6.3. Untersuchungen mit 40 Humanseren

Wir untersuchten mit unserer Methode Seren von 40 gesunden Personen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 7 aufgeführt.

Tabelle 7:

Meßergebnisse von 40 Humanseren, die nach unserer Methode untersucht wurden

Proband Nr.	ChE-Aktivität "unvergiftet"	ChE-Aktivität "vergiftet"	ChE-Rest- Aktivität
	U/l	U/l	%
1	6568,8	93,8	1,43
2	5865,0	117,3	2,00
3	5630,4	117,3	2,08
4	5395,8	117,3	2,17
5	5395,8	117,3	2,17
6	5395,8	117,3	2,17
7	5161,2	117,3	2,27
8	5161,2	117,3	2,27
9	4457,4	103,2	2,31
10	6099,6	140,8	2,31

Forts. Tabelle 7:

Proband Nr.	ChE-Aktivität "unvergiftet"	ChE-Aktivität "vergiftet"	ChE-Rest- Aktivität
	U/l	U/l	%
11	4222,8	103,2	2,44
12	4692,0	117,3	2,50
13	4692,0	117,3	2,50
14	3636,3	93,8	2,58
15	4692,0	131,4	2,80
16	3284,4	93,8	2,86
17	3284,4	93,8	2,86
18	7976,4	234,6	2,94
19	3753,6	117,3	3,13
20	4222,8	140,8	3,33
21	3988,2	140,8	3,53
22	3284,4	117,3	3,57
23	4926,6	187,7	3,81
24	1994,1	93,8	4,71
25	2815,2	140,8	5,00
26	4926,6	305,0	6,20
27	5865,0	375,4	6,40
28	4340,1	328,4	7,57

Forts. Tabelle 7:

Proband Nr.	ChE-Aktivität "unvergiftet"	ChE-Aktivität "vergiftet"	ChE-Rest- Aktivität
	U/l	U/l	%
29	4457,4	351,9	7,89
30	7272,6	844,6	11,61
31	6803,4	844,6	12,40
32	5161,2	656,9	12,73
33	1759,5	234,6	13,33
34	6568,8	961,9	14,64
35	6334,2	938,4	14,81
36	9853,2	1524,9	15,48
37	4457,4	750,7	16,84
38	4926,6	844,6	17,14
39	3894,4	750,7	19,30
40	9853,2	4692,0	47,62

Die Abbildungen 4 und 5 geben Aufschluß über die Verteilung der Restaktivitäten dieser 40 Seren.

Abb. 4: Restaktivitäten der 40 gemessenen Serien



Abb. 5: Verteilung der Restaktivitäten der 40 gemessenen Serien



6.4. Aufgliederung der 40 gemessenen Humanseren in drei Gruppen hoher, mittlerer und niedriger Cholinesterase-Restaktivität

Bei den 40 von uns gemessenen Humanseren läßt sich eine deutliche Aufgliederung in drei Gruppen hoher, mittlerer und niedriger Cholinesterase-Restaktivität feststellen.

In Tabelle 8 sind diese drei Gruppen aufgeschlüsselt. Der Gruppe I mit niedriger Cholinesterase-Restaktivität von 1-9 % konnten wir 29 Testpersonen zurechnen. 10 Probanden der mittleren Restaktivität von 11-20 % waren der Gruppe II zuzuordnen. Nur eines unserer 40 Testseren fanden wir mit 48 % für die Gruppe III hoher ChE-Restaktivität.

Tabelle 8:

Aufgliederung der 40 gemessenen Humanseren in drei Gruppen hoher, mittlerer und niedriger Cholinesterase-Restaktivität

Gruppe	Anzahl d. Personen	ChE-Restaktivität in % der Normal- aktivität
I	29	1-9 % (niedrig)
II	10	11-20 % (mittel)
III	1	48 % (hoch)

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen lassen auf die Möglichkeit einer Korrelation zu Meßwerten hoffen, die sich bei Anwendung anderer Methoden der Para-oxonase-Bestimmung ergeben. Dies muß durch weitere Untersuchungen geklärt werden.

7. Die Möglichkeit der Serienmessung bei geringem Zeitaufwand

Da bei dieser Methode Einzelmessungen in 5-minütigen Abständen möglich sind, ist die Cholinesterase-Restaktivitätsbestimmung einer großen Anzahl menschlicher Seren in kürzester Zeit möglich.

Abbildung 6 zeigt schematisch das Beispiel des zeitlichen Ablaufs einer derartigen Serienmessung. Es können auf diese Weise in drei Stunden 24 Messungen durchgeführt werden (Cholinesterase-Restaktivitätsbestimmung von 12 Probanden) und in jeder weiteren Stunde abermals 12 Messungen erfolgen.

A:	8.00	8.05	8.10	8.15	8.20	8.25	8.30	8.35	8.40	8.45	8.50	8.55
B:	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.	10.	11.	12.
C:	9.00	9.05	9.10	9.15	9.20	9.25	9.30	9.35	9.40	9.45	9.50	9.55
A:	9.02	9.07	9.12	9.17	9.22	9.27	9.32	9.37	9.42	9.47	9.52	9.57
B:	13.	14.	15.	16.	17.	18.	19.	20.	21.	22.	23.	24.
C:	10.02	10.07	10.12	10.17	10.22	10.27	10.32	10.37	10.42	10.47	10.52	10.57
A:	10.00	10.05	10.10	10.15	10.20	10.25	10.30	10.35	10.40	10.45	10.50	10.55
B:	25.	26.	27.	28.	29.	30.	31.	32.	33.	34.	35.	36.
C:	11.00	11.05	11.10	11.15	11.20	11.25	11.30	11.35	11.40	11.45	11.50	11.55
A:	Uhrzeit des Probenansatzes und Beginn der Inkubation											
B:	Probe-Nr.											
C:	Uhrzeit der Messung											

Abb. 6: Beispiel der rationalen Serienmessung

8. Diskussion

Die vorliegende Methode zur Bestimmung der Cholinesterase-Restaktivität in Prozent der Ausgangsaktivität zeichnet sich durch einfache und schnelle Versuchsdurchführung aus. Sie dürfte daher besonders im Hinblick auf Serienmessungen einer größeren Probandenzahl interessant sein.

Nach anfänglichen Schwierigkeiten bei der Herstellung einer reproduzierbaren Paraaxon-Verdünnung konnten gute Präzisionswerte erzielt werden. Unter ungünstigsten Versuchsbedingungen, bei Verwendung eines schwierig zu messenden Serums von niedriger Paraaxonase-Aktivität betrug der Variationskoeffizient $v = 10,15 \%$, wenn vor jeder Einzelmessung die Paraaxon-Verdünnung erneut angemischt wurde. Bei Verwendung stets der gleichen Paraaxon-Verdünnung erniedrigte sich der Variationskoeffizient auf $v = 7,81 \%$. Der Unterschied ergibt sich aus der Schwierigkeit, eine reproduzierbare E 600-Verdünnung von $2,3 \times 10^{-8}$ molar herzustellen.

Da auch mit Hilfe dieser Methode eine Differenzierung in Typen hoher, mittlerer und niedriger Cholinesterase-Restaktivität nach Vergiftung mit Paraaxon festgestellt werden konnte, läßt sich eine Beziehung zu Ergebnissen vermuten, die GELDMACHER - V. MALLINCK-ROOT et al. unter Anwendung der Warburg-Apparatur erzielten. Es wird die Aufgabe weiterer Untersuchungen sein, eine diesbezügliche Relation zu überprüfen.

9. Zusammenfassung

Es wird eine neue Methode zur Bestimmung der Cholinesterase-Restaktivität menschlicher Seren nach Vergiftung mit E 600 beschrieben.

Menschliches Serum wurde mit einer E 600-Verdünnung von $2,3 \times 10^{-8}$ molar vergiftet und dessen Cholinesterase-Aktivität mit derjenigen des unvergifteten Serums verglichen. Entsprechend der "Anti-Cholinesterase-Technik" gibt die resultierende prozentuale Cholinesterase-Restaktivität Aufschluß über die Paraoxonase-Aktivität des gemessenen Serums.

Die Cholinesterase-Aktivitäten wurden auf photometrischem Weg mit Hilfe der "Test-Combination Cholinesterase" ermittelt. Dieser Test beruht auf der Spaltung des Butyrylthiocholin durch die menschliche Cholinesterase in Thiocholin und Butyrat sowie der anschließenden Reaktion des Thiocholin mit dem Chromogen Dithiobisnitrobenzoat, wobei der gelbe, photometrisch bei 405 nm nachweisbare Farbstoff 2-Nitro-5-mercaptobenzoat entsteht.

Mit dieser Methode konnten Meßergebnisse guter Präzision erzielt werden. Im ungünstigsten Fall, d.h. bei niedriger Paraoxonase-Aktivität des Serums, lag der Variationskoeffizient bei $v = 10,15 \%$.

Die Untersuchung von 40 Humansenen ergab eine Aufteilung der Cholinesterase-Restaktivitäten in Typen niedriger, mittlerer und hoher Aktivität im Verhältnis 29 : 10 : 1.

10. Literaturverzeichnis

ALDRIDGE, W.N.:

Serum Esterase 1. Two types of esterase (A und B) hydrolysing p-nitrophenyl acetat, propionate and butyrate, and a method of their determination.
Biochem. J. 53, 110 (1953 a)

ALDRIDGE, W.N.:

Serum Esterases 2. An enzyme hydrolysing diethyl-p-nitrophenyl phosphate (E 600) and its identity with the A-esterase of mammalian sera.
Biochem. J. 53, 117 (1953 b)

AUGUSTINSSON, K.-B. and G. HEIMBÜRGER:

The enzymic hydrolysis of organophosphorus compounds.
Biochem. Biophys. Acta 13, 303 (1954)

DUMBACH, J.:

Statistische Analyse zur Genetik der menschlichen Serumparaaxonase (EC 3.1.1.2.)
Dissertation Erlangen 1976

FRIEDBERG, K.D. und SAKAI, F.:

Spezifischer Nachweis von Vergiftungen mit Alkylphosphaten (E 600, E 605, Systox) im Blut und Hirngewebe mit Hilfe eines fermentreaktivierenden Antidots (Pyridin-Aldoxim-Methyljodid, PAM).
Dtsch. Z. ges. gerichtl. Med. 47, 580 (1958)

GELDMACHER - V. MALLINCKRODT, M., Rabast, U. und Lindorf, H.H.:

Unterschiedliche Reaktion menschlicher Serum-Cholinesterasen mit E 600 (O,O-Diäthyl-O-(p-nitrophenyl)-phosphat).

Arch. Toxikol. 25, 223 (1969)

GELDMACHER - V. MALLINCKRODT, M., Baumgartner, W., Petenyi, M., Burgis, H., Lindorf, H.H. und Metzner, H.:

Korrelation zwischen der unterschiedlichen Vergiftbarkeit der Serum-Cholinesterase durch E 600 und der Aktivität des E 600-spaltenden Enzym-Systems in menschlichen Seren.

Z. Physiol. Chem. 353, 217 (1972)

GELDMACHER - V. MALLINCKRODT, M., Lindorf, H.H., Petenyi, M., Flügel, M., Fischer, Th. und Hiller, Th.:

Genetisch determinierter Polymorphismus der menschlichen Serum-Paraoxonase (EC 3.1.1.2.)

Humangenetik 17, 331 (1973)

GELDMACHER - V. MALLINCKRODT, M., Petenyi, M., Flügel, M., Burgis, H., Dietzel, B., Metzner, H., Nirschl, H., Renner, G.:

Zur Spezifität der menschlichen Serum-Paraoxonase.

Z. Physiol. Chem. 354, 337 (1973)

KNEDEL, M. und BÖTTGER, R.:

Eine kinetische Methode zur Bestimmung der Aktivität der Pseudocholinesterase.

Klin. Wschr. 45, 325 (1967)

KRISCH, K.:

Enzymatische Hydrolyse von Diäthyl-p-nitrophenylphosphat (E 600) durch menschliches Serum.

Z. klin. Chem. klin. Biochem. 6, 41 (1968)

MAIN, A. R.:

The purification of the enzyme hydrolysing diethyl-p-nitrophenylphosphate (paraoxon) in sheep serum.

Biochem. J. 74, 10 (1960)

POORE, R. E., NEAL, R. A.:

Evidence for extrahepatic metabolism of parathion.

Toxokol. appl. Pharmakol. 23, 759 (1972)

Zum Schluß der Arbeit erlaube ich mir, Herrn
Professor Dr. H.-B. W u e r m e l i n g für die
Arbeitsmöglichkeit in seinem Institut und für die
Übernahme des Korreferates zu danken.

Mein besonderer Dank gilt Frau Professor Dr. Dr.
M. G e l d m a c h e r - v. M a l l i n c k r o d t
für die Überlassung dieses Themas, ihre ungewöhn-
lich große Hilfsbereitschaft und für den zu jeder
Zeit freundlich erteilten Rat.

Meinen besten Dank darf ich der Firma BOEHRINGER
Mannheim, für die freundlicherweise zur Verfügung
gestellten "Test-Combinationen Cholinesterase"
aussprechen.

Lebenslauf

10. 3. 1954 Geboren in Coburg als zweites von drei Kindern
Vater: Heinrich Lochner, Forstamtsrat
Mutter: Erika Lochner, geb. Böhland
- 1960 - 1965 Besuch der Volksschule in Lindenhartdt,
Kreis Bayreuth
- 1965 - 1974 Besuch des Graf-Münster-Gymnasiums in
Bayreuth
22. Juni 74 Abitur
- Juli 74 -
September 75 Ableistung des Grundwehrdienstes in
Regensburg
30. 9. 1975 Beginn des Studiums der Zahnheilkunde
an der Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen-Nürnberg
10. 8. 1976 Vorphysikum in Erlangen
4. 4. 1978 Physikum in Erlangen
7. 11. 1980 Staatsexamen
14. 11. 1980 Bestallung als Zahnarzt

Copy-Center 2000

852 ERLANGEN · Obere Karlstr. 30
Tel. 09131-26197